

逆ミセルを用いた水の構造化とその機能性に関する研究

静岡県立大学 経営情報学部

五 島 綾 子

Reversed micelles can control the size of water pools and the physical property of water by changing $W_o(=[\text{water}]/[\text{surfactant}])$. The property of bound water and its function were studied based upon the enzymatic catalysis and the dimerization of cysteine by the irradiation in water pools. Sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT), hexadecyltrimethyl ammonium chloride (HTAC) and octaethylene dodecylether ($C_{12}E_8$) were used as anionic, cationic and nonionic surfactants, respectively. Hexokinase (HK) and polynucleotide phosphorylase (PNPase) were used as enzymes. The electrostatic effect due to the inner surfaces of AOT and HTAC reversed micelles increased with increasing W_o , leading to the suppression of the HK activity. On the other hand, high HK activity was revealed in hydrated ethyleneoxide chains of $C_{12}E_8$. The PNPase could also polymerize ADP in $C_{12}E_8$ reversed micelles by using a small amount of Fe^{3+} instead of Mg^{2+} . Furthermore, it was found that the formed poly(A) was precipitated with increasing temperature. This means that the formed poly(A) can be isolated easily from the reversed micellar solution. This phenomenon is closely related with appearance of free water molecules due to elevation of temperature.

The effect of bound water on the conversion of cysteine by UV irradiation was studied. It was assumed that the solubilized cysteine in water pools was easily converted into cystine in bound water by UV irradiation. The results suggested a long life time of activated oxygens produced by UV irradiation in bound water region.

1. 緒 言

肌の保水効果を維持する化粧品の研究開発とともに、近年では水自体の性質が紫外線照射による皮膚の生理機能との関連も推測され、一層水と化粧品との関わりが深くなりつつある。水は大きく分けて自由水と構造化された結合水に分けられる。結合水は自由水に比べ、蒸発しにくいなどその一般的な性質はよく知られている。しかし結合水は総称であり、構造化の程度や性質は親水基やイオンの種類により異なることが予測されているが、系統的な研究はなされていない。その理由として水溶液中では自由水が多量に存在するので、結合水の性質を直接特定できないからである。

油の中で界面活性剤と少量の水により形成される逆ミセルにはその内殻の界面活性剤の親水基近傍に構造化された結合水が存在し、 $W_o(=[\text{水}]/[\text{界面活性剤}])$ を変えることにより、結合水/自由水の割合を調整することができる。一方、界面活性剤の親水基の構造を変えたり電荷を持たせたりすることで、逆ミセル界面に構造化された結合水の直接的な情報を得ることができる¹⁻⁷⁾。水の構造化と

紫外線、放射線によるラジカル発生の関係についても成果が現在期待されている。

本報告書においては水の構造化と機能を逆ミセルの water pool を用いて二つの視点で捉えた研究成果を報告する。一つは逆ミセルの water pool に酵素を溶解し、水の構造化が酵素活性に及ぼす影響を明らかにする。酵素としては細胞に幅広く存在し、糖代謝に深く関わる基本的な酵素、ヘキソキナーゼ (Hexokinase, HK) と著者らのグループが研究対象として検討してきたポリヌクレオチドフォスフォリラーゼ (Polynucleotide phosphorylase, PNPase) を用いた⁸⁻¹⁰⁾。さらにもう一つの研究は紫外線や放射線の照射により活性酸素が発生するが、この発生と水の構造化との関係を明らかにするため、逆ミセルの water pool にシステインを溶解し、その重合化から検討した。

2. 実験の部

2.1 ヘキソキナーゼを用いた実験

試薬

界面活性剤として Sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT, Sigma)、Hexadecyltrimethyl ammonium chloride (HTAC, Merck) 及び Octaethylene glycol dodecyl ether ($C_{12}E_8$, 日光ケミカルズ) を用いた。HTAC はアセトノーメタノール混合溶媒で再結晶した。ヘキソキナーゼ (Hexokinase, HK, Boeringer Mannheim) は酵母由来である。Adenosine 5'-diphosphate trisodium salts (ATP, Fluka), 2-Deoxy-D-(+) glucose (DG, Sigma) やその他の反応基質は Fluka や関東から購入した。



Study of Hydration and its Function by Using Reversed Micellar Systems

Ayako Goto

School of Administration and Informatics

実験

逆ミセル溶液の調製：Isooctane に乾燥した AOT を適量溶解した溶液に W_o に応じて 50mM Tris / HCl 緩衝液 (pH8.0) を溶解する。HTAC 逆ミセルの調製は有機溶媒として Isooctane/octanol (85 : 15v/v) を、 $C_{12}E_8$ 逆ミセルの調製は Isooctane/octanol (90 : 10v/v) を用いた。

酵素反応：逆ミセル系の酵素反応は AOT 及び W_o が同じ溶液を二つ調製し、一方には DG と HK を、他方には ATP と $MgCl_2$ を溶解し、両者を 0.5mL ずつ混和後、37℃ で反応を開始した。ATP 及び DG の water pool における最初の濃度は 10mM 及び 30mM であり、 $MgCl_2$ の water pool における濃度は 20mM であった。なお HK の water pool における濃度は AOT 及び HTAC に関しては 1.74mg/mL であり、バルク水溶液及び $C_{12}E_8$ の場合は 0.0174mg/mL であった。酵素活性は反応溶液 0.1mL を緩衝液と $CHCl_3$ で抽出し、遠心分離後、水層中の ADP 及び ATP を HPLC で測定した。HPLC は Shim-pack WAX-1 と Shim-pack プレカラム Doil を用いグラディエント法により検出した。なお HK のみかけの Kinetic parameter は Eadie Hofstee plots に従った。

ミセルの大きさの測定：逆ミセルの大きさは動的光散乱 (DLS700, 大塚電子) により測定した。

2.2 フォスホリラーゼを用いた実験

試薬

Polynucleotidephosphorylase (PNPase, E.coli. 由来、Sigma)、ADP (Fluka)、 ^{14}C -Adenosine 5'-diphosphate trisodium salt (^{14}C -ADP, NEN) などを使用した。NMR 測定には $H_2^{17}O$, d-octane を用いた。その他は 2.1 と同じであった。

実験

2.1 と同様に AOT は Isooctane に、 $C_{12}E_8$ は 12% v/v 1-Octanol/Isooctane に溶解し、逆ミセル溶液とした。基本的には 2.1 で述べた方法に従う。ADP を溶解した 50mM Tris 緩衝液 (pH9.5) を 0.2M 逆ミセル溶液に各々の W_o になるように溶解した。同様に PNPase を同じ W_o になるように溶解し、同量の 150 μ L ずつ混和し、反応を開始した。 ^{14}C -ADP と ADP を合わせた濃度を 2.0mM (1.85kBq) とし、PNPase は 2.5unit を使用した。反応後、反応液を上清と沈殿に分け、それぞれに 0.2% アルブミンと 10% トリクロロ酢酸を加え、反応を停止した。エタノール 1000 μ L を加え、ガラスフィルターでろ過し、Tris 緩衝液とエタノールそれぞれ 1000 μ L で 2 回洗浄し、ろ過後、液体シンチレーションカウンターでガラスフィルター上の放射エネルギーを測定した。

生成 poly (A) の確認はアガロース電気泳動及びキャピラリー電気泳動を行った。アガロース電気泳動は 1.8

%アガロースゲルで行い、各々のゲルの断片中の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターで測定した。キャピラリー電気泳動は充填剤に Oligonucleotide Polymer Solution A、泳動緩衝液として Oligonucleotide 緩衝液を用いて、HP 3DCapillary Electrophoresis System (Hewlett PACKARD 社) で 30 分測定した。

逆ミセルのサイズ分布の測定は 2.1 で述べたものと同じであった。

NMR は 500MHzFT-NMR ^{17}O プローブ (日本電子、GSX500) で測定した。

2.3 システインの光重合反応

試薬

界面活性剤は 2.1 と同様なものを用いた。Cysteine は Sigma 製を用いた。

実験方法

逆ミセルは 2.1 と同様な方法に従い調製した。逆ミセルに可溶化する緩衝液は 50mM Tris 溶液 (pH 9) を用いた。water pool における cysteine 濃度は主に 50mM であった。UVA、UVB の照射にはアトー社製 HP-30LM、UVC はアトー社製 HP-50C を用いた。SH 基の変化は蛍光試薬である N- (9-acridinyl) maleimide を用いて、蛍光高度計 (F-4500, HITACHI) で測定した。逆ミセル溶液の試料の場合はメタノール/水混合溶媒で希釈し測定した。

3. 結果と考察

3.1 逆ミセルの water pool に溶解した酵素活性と水の構造化との関係

3.1.1 ヘキソキナーゼについて¹¹⁾

ヘキソキナーゼ (Hexokinase ; HK) は細胞における糖代謝に重要な酵素である。この HK は Mg^{2+} イオン存在下、りん酸基のドナーとして ATP を用いてグルコースのりん酸化を触媒する酵素である¹²⁾。この HK の活性は酵素のまわりの微視的環境に大きく依存する。例えば HK は NH_2 を末端につけた疎水基を持ち、この疎水基をミトコンドリアの生体膜に貫入し、その活性を制御していると言われる。またこの HK はグルコースと結合すると、HK の構造はドラマチックに変化し、水分子が外に追い出されることも推測されている。すなわちこの HK の活性は水の性質や媒体の電場や極性に大きく依存することが推測される^{13~16)}。

そこで界面活性剤として陰イオン性で最もその逆ミセルのキャラクタリゼーションが判明している AOT とともに、荷電効果を調べるために、陽イオン性の界面活性剤として HTAC、非イオン性の界面活性剤として $C_{12}E_8$ を用いた。Fig. 1 は AOT 逆ミセル溶液における HK の活性に対する W_o の影響を示している。 $W_o = 10$ のところで極大値が認

められる。しかし全体としてバルク水溶液における HK の活性と比較すると低下し、バルク水溶液のそれを 1 とすると $W_o = 10$ で 0.015 であった。このように W_o に最適値が出現する理由として以下のように推測される。反応基質の ATP は負電荷を持ち、一方、AOT 逆ミセルの内側の界面も $-\text{SO}_3^-$ 基の負電荷で覆われ、相互に電氣的反発力が働き、ATP は water pool の中央に局在するであろう。一方、HK は NH_2 基は疎水基の先端に持っているので、静電力と疎水結合で AOT 単分子膜層近くに局在あるいは埋め込まれている可能性もある。しかし W_o が大きくなるにつ

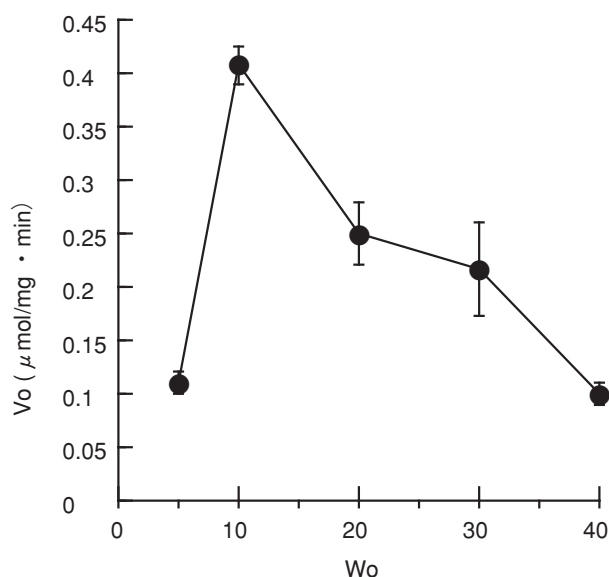


Fig.1 Effect of W_o on HK activity in 0.1M AOT/isooctane reversed micelles at 37°C

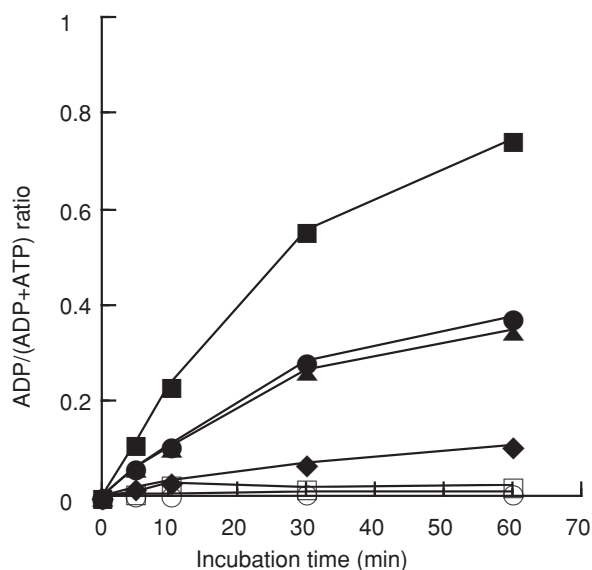


Fig.2 Substrate specificity of HK in 0.1M AOT/isooctane reversed micelles ($W_o=10$) at 37°C

■, D-(+)-Glucosamine; ●, 1-Thio-D-glucose; ▲, 2-Deoxy-D-glucose; ◆, Fructose; □, D Mannose; ○, N-Acetyl-D-glucosamine

れ自由水が出現し極性が高くなり、一層電場効果が顕著に現われ、酵素と ATP の距離は離れ HK の活性にマイナスに働く。一方、HK はバルク水溶液中で活性を高く示すので、water pool が大きくなり、 $W_o = 10$ を超えると自由水が出現すると有利に作用すると推測される。この相反する二つの効果により W_o に最適値が出現すると推測される。これは water pool の KCl の濃度の増加させると、HK の活性が増加し、最適 W_o が消えることから支持された。すなわち負電荷の AOT 単分子層に K^+ イオンが十分吸着され、塩析効果も働き、HK は膜から追い出され、water pool の中央に局在するようになり、ATP と HK の距離を縮めて触媒効果が高まると推測される。

このように AOT 逆ミセル中では HK の酵素活性は低下するが、Fig. 2 に示すように種々の糖を用いた基質特異性の実験で AOT 逆ミセル中で HK が基質特異性を保持していることが判明した。それぞれの基質特異性の比率はバルク水溶液と同じであった。しかし AOT 逆ミセル中では至適 pH はバルク水溶液系のそれに比べ 0.5 アルカリ方向へシフトしていた (Fig. 3)。これは AOT の陰イオンの電荷により H^+ が吸着され、water pool 中で H^+ の分布が不均一になったためであると思われる。

Fig. 4 は HTAC 逆ミセル溶液における HK の活性に対する W_o の影響を示している。AOT 逆ミセルと同様に $W_o = 10$ 付近で極大値を示すが、HK の活性は AOT 逆ミセルの活性に比べ、全体にわたり 2 倍高い。これは陽電荷の表面は負電荷の表面に比べ HK 活性の発現に有利に働くと推測される。水溶液中で陰イオン性界面活性剤ミセルにより HK は容易に可溶化されるが、陽イオン性界面活性剤ミセルには HK は可溶化されないことが知られているので¹⁷⁾、

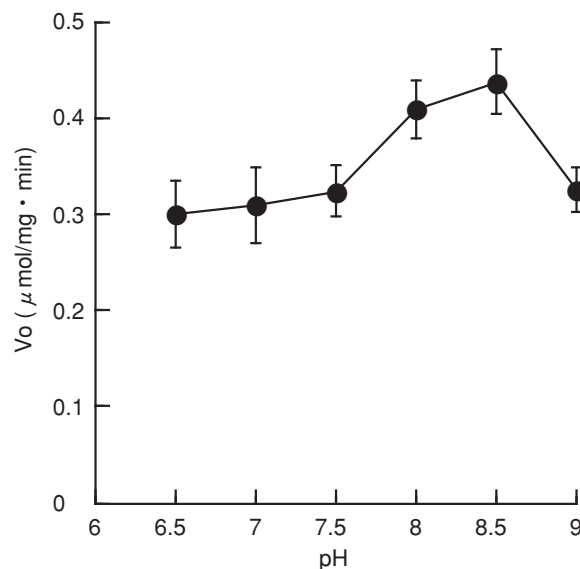


Fig.3 Effect of pH on HK activity in 0.1M AOT/isooctane reversed micelles ($W_o=10$) at 37°C

同様に HK の-NH₂ により HTAC 逆ミセルの膜界面に HK は深く貫入せず、HK のコンフォメーションが変化しやすいことがあげられる。また HTAC 逆ミセルの方が AOT 逆ミセルに比べ、そのサイズが大きいことも HK の活性発現に有利に働くように思われる。

C₁₂E₈ 逆ミセル系では W_o が 20 まで徐々に HK 活性は上昇し、その後なだらかに増加し、W_o = 30 で最大値を示した (Fig. 5)。C₁₂E₈ 逆ミセル中の酵素活性は AOT 逆ミセルや HTAC 逆ミセルのそれらに比べ非常に高く、ほぼバルク水のそれと等しかった。また極大値を示した W_o = 30 にお

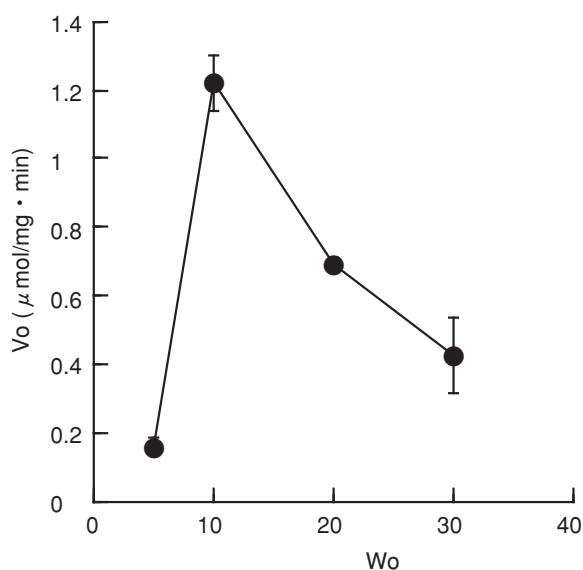


Fig.4 Effect of W_o on HK activity in 0.1M HTAC/isooctane-octanol reversed micelles at 37°C

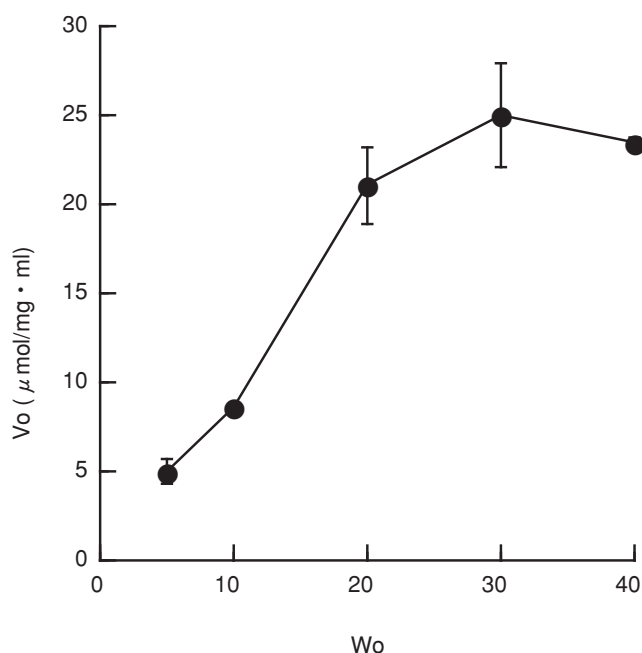


Fig.5 Effect of W_o on HK activity in 0.1M C₁₂E₈/isooctane-octanol reversed micelles at 37°C

いて pH 効果を検討した結果、至適 pH はバルク水のそれと等しく H⁺ の分布はバルク水の H⁺ の分布と等しいと推測された。しかし C₁₂E₈ の濃度効果を検討した結果、HK の活性は濃度の増加とともに増加した (Fig. 6)。通常 W_o を一定にしておけば、界面活性剤の濃度を変化させても、water pool の状態は変わらないはずである。界面活性剤の濃度とともに活性が低下する場合は、酵素が逆ミセルの膜と結合している場合が多い¹⁸⁾。AOT 系での HK の活性に対する AOT 濃度の効果はこれに相当する (データは示されていない)。しかし反対に界面活性剤濃度とともに活性が増加する場合は、逆ミセルや水の構造の変化が起きている場合で、酵素は膜と結合していないと推測される。C₁₂E₈ 逆ミセルの場合は後者に相当する。

表 1 は AOT、HTAC 及び C₁₂E₈ 逆ミセル、バルク水溶液の見かけの V_{max} 及び K_m を示している。見かけの V_{max} は AOT < HTAC < C₁₂E₈ 逆ミセル < バルク水溶液の順であった。みかけの K_m は C₁₂E₈ 逆ミセル中ではバルク水溶液のそれと等しいが、AOT や HTAC 逆ミセルのそれらよりかなり低かった。これは C₁₂E₈ 逆ミセル中では HK と基質の相互作用がバルク水溶液とほぼ等しく、AOT や HTAC 逆ミセルの場合と大きく異なることを示している。

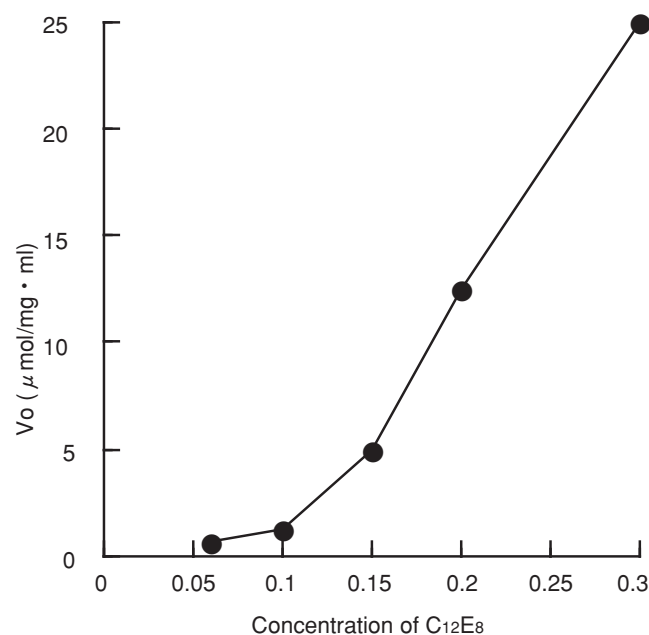


Fig.6 Effect of C₁₂E₈ concentration on HK activity in C₁₂E₈/isooctane-octanol reversed micelles (W_o=30) at 37°C

Table 1 Apparent kinetic parameters of HK in three kinds of reversed micellar solution

	bulk water	AOT	HTAC	C ₁₂ E ₈
km (μmol/ml)	0.99	3.69	2.79	1.02
Vmax (μmol/min)	26.81	5.11	13.48	18.93

HK は前述したようにミトコンドリア表面に疎水結合と静電力で結合し、HK がグルコースを抱き込むと、そのコンフォメーションが大きく変化すると推測されているが、三種類の逆ミセルの中での酵素活性から、HK の活性は微視的環境に大きく依存することが判明した。上記の結果から、AOT、HTAC、 $C_{12}E_8$ 逆ミセルにおける酵素反応のスキーム (Fig. 7) を示す。AOT 逆ミセルの場合は HK のアルキル基とその末端のアミノ基により HK が膜に結合し、埋め込まれたような状態となり、HK のコンフォメーションが変化しにくく反応が進行しにくいことがまず第一にあげられる。HTAC 逆ミセルの場合は、HTAC の陽電荷と HK のアミノ基の電氣的反発力により比較的 water pool の中央に位置するとともに、動的分散の測定から、AOT 逆ミセルの大きさに比べ、HTAC 逆ミセルの大きさは大きいので、酵素がコンフォメーションが変化しやすいことが考えられる。さらに陰イオン性、陽イオン性の界面活性剤からなる逆ミセルの water pool は静電力が強く、特に W_o が大きくなると自由水が増加しその傾向は強くなる傾向にある。従って反応基質の ATP や H^+ の water pool における分布が電荷のある表面膜に強く影響を受け、反応基質と酵素の距離や pH を変化させることになり、HK の触媒的作用を抑制する。

他方、非イオン性 $C_{12}E_8$ 逆ミセルは HK の触媒活性に有利であった。その理由として二つあげられる。1) 静電場効果がないので、反応基質、HK、 H^+ の分布が逆ミセルの中で比較的均一に分布する。2) $C_{12}E_8$ 逆ミセルの特異的な構造が挙げられる。 $C_{12}E_8$ 逆ミセルははっきりした境界領域が分かれた water pool を持っているのではなく、殆どの水分子は $W_o = 30$ ぐらいまでは、エチレンオキサイド鎖に水和している^{19, 20)}。エチレンオキサイド基はアルキル基より長く、エチレンオキサイド鎖と水和水からなるマントル層であり、この中に酵素も反応基質も存在し、容易に反応基

質と結合し、反応が進行していくと推測される。in vivo において脂質膜はポリサッカライドとその結合水で覆われ、この状態はエチレンオキサイド層からなるマントルと類似していると考えられる。HK の活性は HK の微視的環境例えば、疎水性、静電効果、結合水のような因子に影響を受けることが判明した。 $C_{12}E_8$ 逆ミセルの場合は、 $W_o = 30$ ぐらいまでは結合水からなると推測されるが、 $W_o = 30$ を超えると、活性が低下するのでエチレンオキサイド層からなるマントルにおいては結合水が有利に働くと推測された。

3. 1. 2 ポリヌクレオチドフォスホリラーゼについて²¹⁾

逆ミセルの water pool の中に酵素、ポリヌクレオチドフォスホリラーゼ (Polynucleotide Phosphorylase, PNPase)、 $FeCl_3$ 、ADP を溶解し、RNA 合成を検討し、water pool の水の性質との関係を検討した。通常は ADP の酵素的重合には Mg^{2+} イオンが有効であるが、今回は低濃度の Fe^{3+} イオンを用いたことが特徴的である。その理由の一つとして、Beljanski²²⁾ が PNPase による核酸塩基の重合化は Fe^{3+} イオンの方が Mg^{2+} イオンに比べ効果があることを報告しているからである。二つ目の理由は、微量の二価、三価鉄塩を含む π Water は実体は不明であるが、特異な生理活性を持つと言われ、その点でも興味深いからである。

Fig. 8 は $0.2M C_{12}E_8$ 逆ミセル溶液の酵素的 ADP 重合化に対する Fe^{3+} と Mg^{2+} イオンの存在下における $25^\circ C$ 及び $37^\circ C$ の結果である。ここで water pool の Fe^{3+} イオン濃度として $FeCl_3$ の飽和濃度の $0.05mM$ を用いているが、 Mg^{2+} イオン濃度が water pool において $10mM$ 濃度を用いた。その理由は Fe^{3+} イオン濃度と同じ Mg^{2+} イオン濃度が $0.05mM$ においては殆ど反応が進行しなかったもので、最も反応が進行した $10mM$ の濃度を用いた。縦軸の重合率は最初に加えた ^{14}C -ADP の全放射エネルギーに対する生成された重合体の放射エネルギーの割合である。Fig. 8 の結果が示すように poly (A)

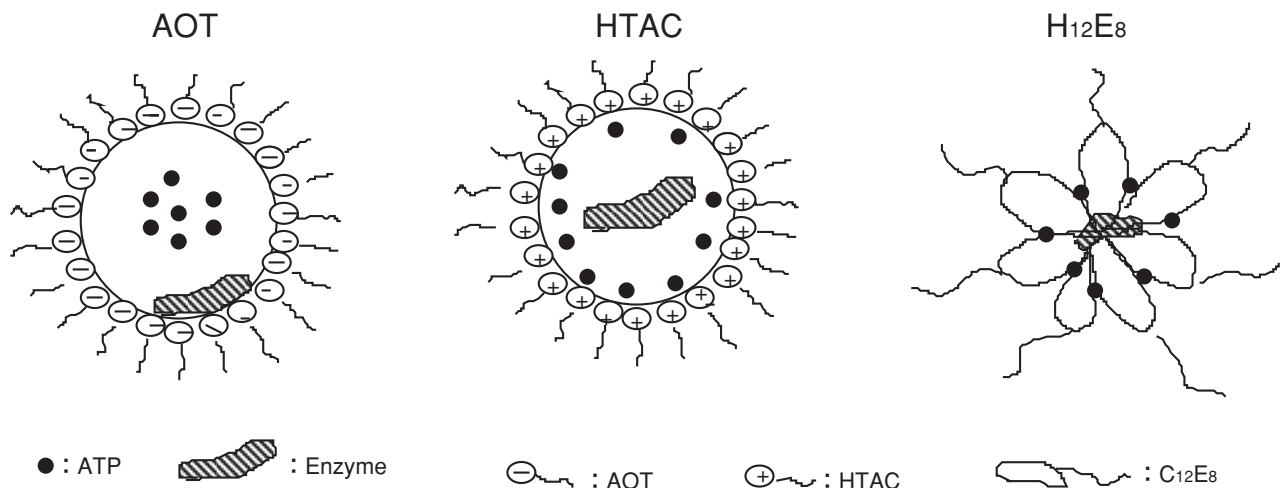
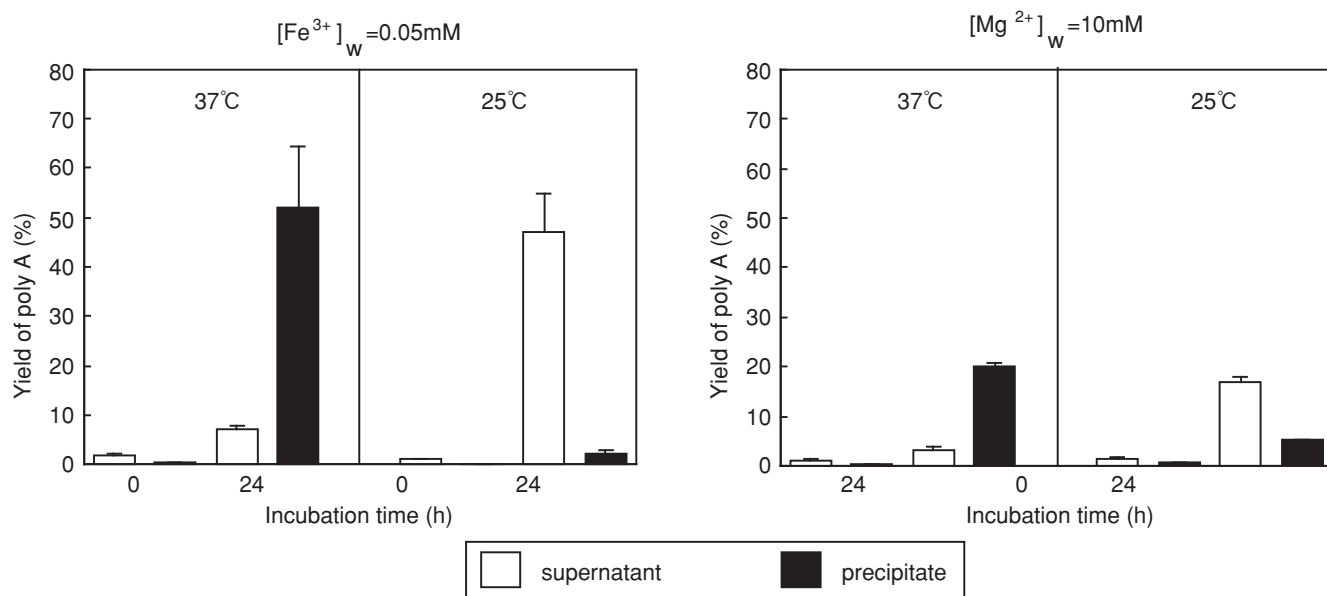


Fig.7 Models of reversed micelles containing HK and ADP

Fig. 8 Effect of Metal Ions and Temperature on ADP Polymerization in C_{12}E_8 Reversed Micellar Solution

生成物は沈殿物と逆ミセル溶液の上澄み液の両者に存在した。この時の逆ミセルの大きさや water pool の特徴を示す W_o ($= [\text{水}] / [\text{界面活性剤}]$) は 20 である。これはすでに報告してある AOT 逆ミセル系で Mg^{2+} イオンを用いた場合、 $W_o = 20$ の場合が最も重合化が進行したからである^{9~11)}。結果は示していないが、Beljanski²²⁾ がすでに報告したように、Tris 緩衝液中では Fe^{3+} イオンは Mg^{2+} イオンに比べ 2 倍効果を示しており、37°C では重合化の程度はほぼ 10% であることが確認された。しかし結果は示していないが、AOT 逆ミセル系では Mg^{2+} イオンの方が Fe^{3+} イオンに比べ圧倒的に効果が高く、しかも 37°C に比べ 25°C の方が生成した poly (A) が沈殿する割合が高い。それに対して Fig. 8 に示されるように、 C_{12}E_8 逆ミセル系では Mg^{2+} イオンに比べ約 2 倍 Fe^{3+} イオンの方が効果的であった。また Fe^{3+} イオンの場合、 C_{12}E_8 逆ミセル系の重合率は水系に比べ 6 倍の 60% の重合率を超え、しかも 37°C で poly (A) が沈殿し、生成された生成物を容易に分取しやすくなることが判明した。

AOT 逆ミセル系においては Fe^{3+} イオンがほとんど効果を示さなかったのは、AOT 逆ミセルの water pool のマイクロ界面が陰イオン性で、特に Fe^{3+} イオンは 3 価のために、Schultz-Hardy の法則に従い、そのマイクロ界面に吸着されやすくなり、water pool の中央は Fe^{3+} イオンの濃度が極めて低くなるためと推測される。一方、反応基質の ADP は負電荷を持つため、AOT 逆ミセルの陰イオン界面と反発し、むしろ water pool の中央に存在する割合は高くなり、重合化が進行しにくいと推測される。前述したように C_{12}E_8 逆ミセル系では AOT 逆ミセル系に比べ電場効果はなく、8 ケのエチレンオキシド基の親水層がアルキル鎖より長く、水素結合により水分子が水和している厚いネッ

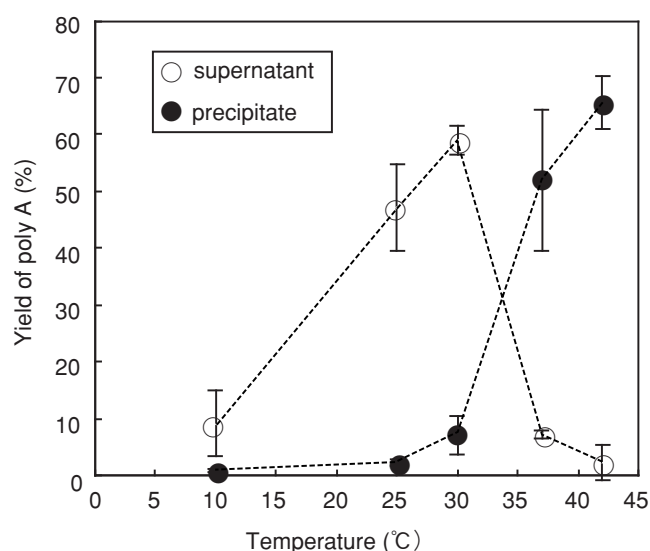


Fig.9 Effect of temperature on polymerization after 24h

ト状でないかと推測される。水溶液中の通常のエチレンオキシド系非イオン性ミセル系においては、 Fe^{3+} イオンはエチレンオキシド鎖の水和水と置換してエチレンオキシド基に結合することが知られているので、逆ミセルにおいても Fe^{3+} イオンはエチレンオキシド基の親水層に ADP とともに存在し、反応が進行すると推測される。このように C_{12}E_8 逆ミセル系では Fe^{3+} イオンの方が活性があり、かつ 37°C で沈殿しやすいので、この現象をさらに詳細に検討した。

Fig. 9 と Fig.10 はそれぞれ C_{12}E_8 逆ミセルの poly (A) 生成に及ぼす温度と反応時間の影響を調べたものである。低温の 10°C では重合化は殆ど進行しないが、反応温度が 30°C 以上になるとほぼ 60% 重合し、それ以上温度を上昇させても総重合率は変化しなかった。しかし 37°C 以上で

は急激な沈殿量の増加が認められた。一方、反応時間の効果を調べると (Fig.10)、6 時間以上で重合化は 60% に達し、それ以後変化しない。しかし 6 時間から 9 時間の間に生成物は沈殿した。すなわち重合化にはある程度の熱が必要であるが、生成物の沈殿には熱とともにある程度の時間が必要であった。エチレンオキサイド鎖をもつ界面活性剤の水溶液における通常のみセルは温度の影響を強く受け、温度を上昇していくと相分離し、水溶液全体が濁ることはよく知られている。これはエチレンオキサイド鎖が脱水和するため、疎水性と親水性のバランスが変化し、疎水性の性質が高まり、相分離するのである。従って逆みセルのエチレンオキサイド鎖の結合水が温度上昇に伴い、脱水和により逆みセルの構造が変化し、その結果、酵素反応に影響すると推測された。言い換えればエチレンオキサイド鎖をもつ界面活性剤の逆みセルの water pool は温度制御可能な酵素の反応場であることを示唆している。

次に 37℃ で 24 時間後の重合化に及ぼす W_o の影響を調べた。 W_o の増加とともに逆みセルのサイズとともに water pool のサイズが増加することはよく知られている¹⁾。よく研究されてきた AOT 逆みセル系については、特に W_o が 10 以下では結合水が存在し、 W_o が 10 以上では water pool の中央に自由水が出現してくることが知られている^{1,6)}。すでに報告したように、AOT 逆みセル系では Mg^{2+} イオン存在下、poly (A) の生成は W_o が 20 で極大を示し、ある大きさの water pool が必要であり、結合水だけでは重合化は進行しないことが判明した¹⁰⁾。すなわち $W_o = 20$ では、結合水と自由水が半々ぐらいの状態が存在し、これが重合に有利に働くと推測された。しかし Fig.11 が示すように、 $C_{12}E_8$ 逆みセルの poly (A) 生成は $W_o < 10$ では重合化はわずかにしか進行しないが、 $W_o >$

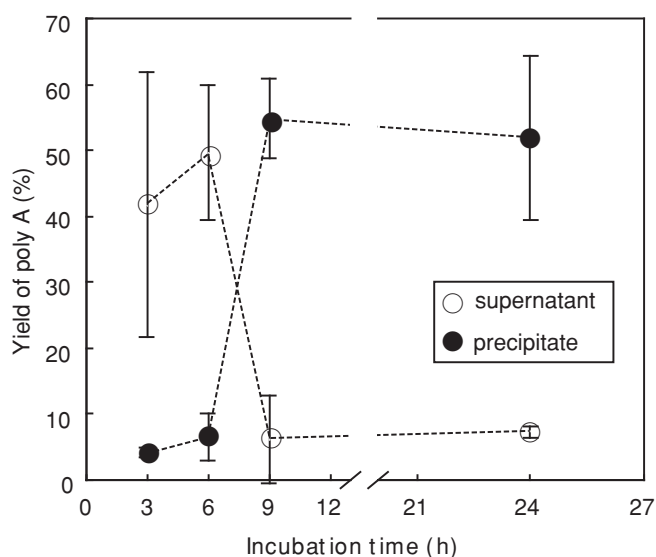


Fig.10 Time course of polymerization at 37°C

15 では重合化は速やかに進行する。すなわちある程度の逆みセルの大きさと自由水の存在が重合に好ましい。しかし $W_o > 15$ で沈殿した poly (A) と上澄み液中の poly (A) を併せた総重合率はほぼ一定であり、自由水が多ければ多いほど、重合化が進行するとはいえない。データは示していないが、0.2M $C_{12}E_8$ 逆みセルの W_o に対して水の $H_2^{17}O$ の NMR の半値幅をプロットすると、 W_o が 10 付近で屈曲点を示し、 $W_o < 10$ では、逆みセル中の殆どの水はエチレンオキサイド基に水和している。しかし $W_o > 10$ で自由水が増加してくることが推測される。すなわち $W_o < 10$ では水が強く構造化され、重合化に対して不利に働くようである。

以上より $C_{12}E_8$ 逆みセル中においては $W_o > 15$ において 37℃ で 6 時間以上の反応時間で poly (A) の重合化が最も高くしかも圧倒的に沈殿することが判明した。この沈殿現象は重合体の単離に都合がよい。そこでこの沈殿現象の機構を検討した。

Fig.12 は $W_o = 20$ の場合の $C_{12}E_8$ 逆みセル中の水の $H_2^{17}O$ の NMR の半値幅を温度に対してプロットしたものである。温度の上昇とともに $H_2^{17}O$ の NMR の半値幅は低下し、水の運動性が増加するが、約 35℃ 以上で $H_2^{17}O$ の NMR の半値幅は一定値に近づく。データは示していないが、温度が上昇すると、逆みセルのサイズは大きくなり、特に water pool に Fe^{3+} が存在すると、逆みセルはさらに大きくなった。我々はすでに AOT 逆みセル系について W_o が増加し、水の運動性が増加すると、逆みセルが集合する Flocculation の現象が起こることを Cryo- 電子顕微

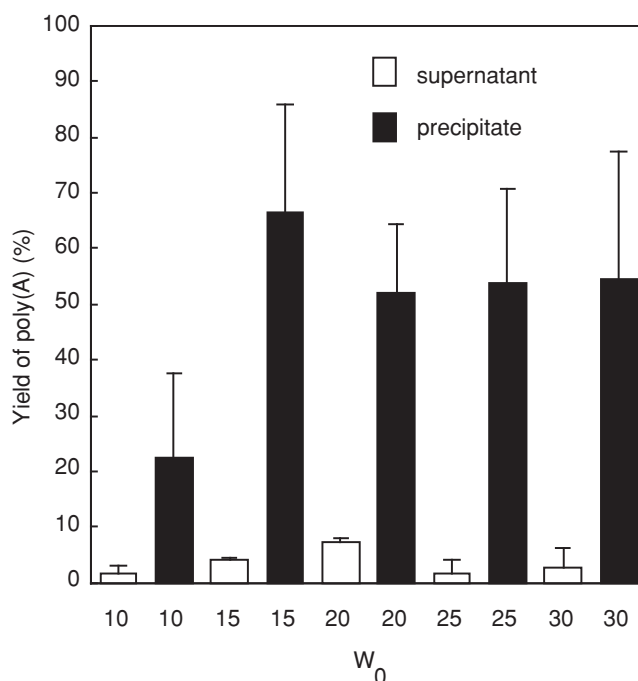


Fig.11 Effect of W_o on the precipitation of poly(A) in $C_{12}E_8$ reversed micellar solution at 37°C

鏡で観察したが⁷⁾、C₁₂E₈ 逆ミセル系についても、温度が上昇と Fe³⁺ の存在が逆ミセルの Flocculation を引き起こしている可能性が推測される。これが温度が 37℃ 以上で、かつ Fe³⁺ が存在すると、PNPase により生成された poly (A) が沈殿する現象の一つの要因として推測された。

逆ミセル系での酵素反応に関する多くの研究は AOT 逆ミセル系についてであった。ここに述べた研究例はエチレンオキサイド基をもつ非イオン性界面活性逆ミセルは系全体が油の系であるにもかかわらず、酵素反応に有利であることを示している。特にエチレンオキサイド基のまわりの結合水は温度感受性で温度の上昇とともに脱水和して曇点

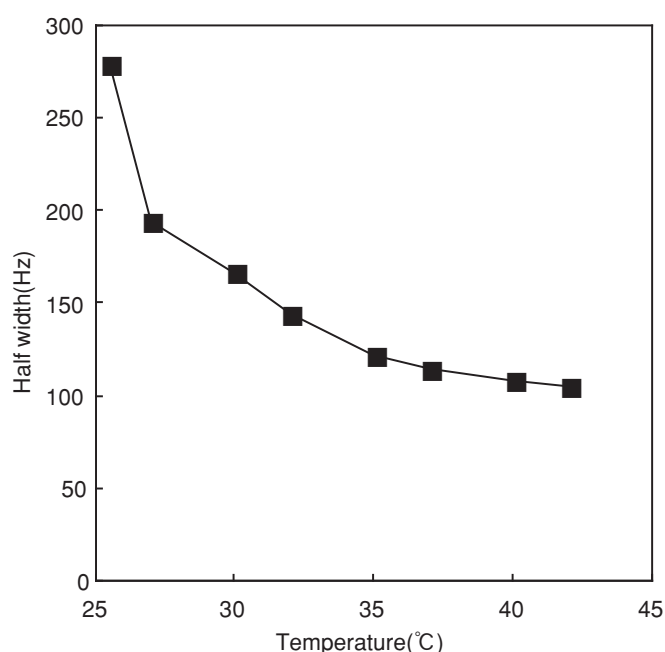


Fig.12 Plots of ¹⁷O line of the H₂ ¹⁷O signal of C₁₂E₈ reversed micelles against temperature

現象を示すことが知られているが、この現象はエチレンオキサイド系界面活性剤逆ミセルの水もその効果を示し、温度を変化させることにより逆ミセルの水の性質を制御し、高分子生成物の単離が可能であることを示した。

3.2 膜界面におけるチオール化合物の光重合²³⁾

環境中に存在する紫外線は UVA 及び UVB で、UVC は殆ど存在していないが、近年のオゾン層破壊にともない UVB の増加が観察されており、さらに破壊が進行し UVC が増加することも懸念されている。紫外線は細胞膜の膜タンパク中の SH 基の酸化（主に S-S 結合の生成）をきたし、レセプターの clustering や膜酵素の不活性化さらに紫外線の情報伝達にも関与している可能性が報告されている^{24, 25)}。本研究では膜タンパク中の SH 基の変化に膜界面の近傍の水の状態（結合水や自由水）と静電場の影響を検討するため逆ミセルを用い、cysteine の SH 基は容易に酸化され、二量化する性質に着目して以下の仮説を立てた。紫外線の照射により脂質膜近傍で産出される活性酸素により cysteine が cystine に酸化されやすいという仮説の基に AOT 逆ミセルを中心にしてその water pool 中に cysteine を溶解し、紫外線照射後の cysteine の変化量を蛍光法により検討した。特に逆ミセルの単分子膜を膜モデルと考え、Wo を変化させて膜界面の水の性質を連続的に変化させて検討した。

cysteine バルク水溶液および water pool 中に cysteine を溶解した逆ミセル溶液に紫外線 (20J/cm²) を照射後の SH 基減少率を測定した (Fig. 13)。バルク水溶液と逆ミセル溶液では SH 基の減少（酸化）に顕著な差が観察された。バルク水溶液においては UVA では SH 基の変化はほとんど見られなかったが、UVB では約 20%、UVC では約 60% の減少であった。この減少は cysteine の SH 基が

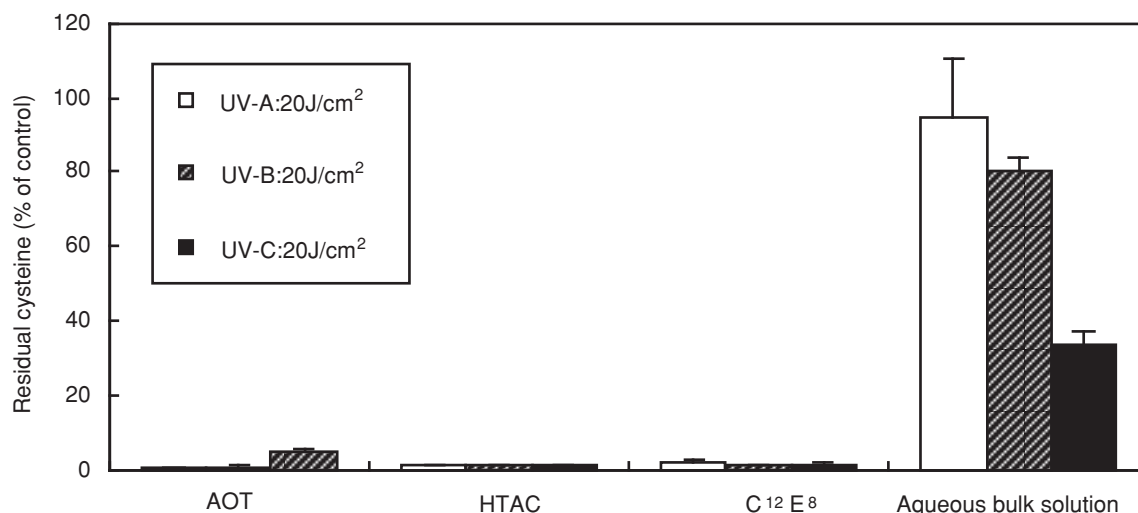


Fig. 13 Conversion of cysteine in reversed micellar solution and in aqueous solution by UV-irradiation

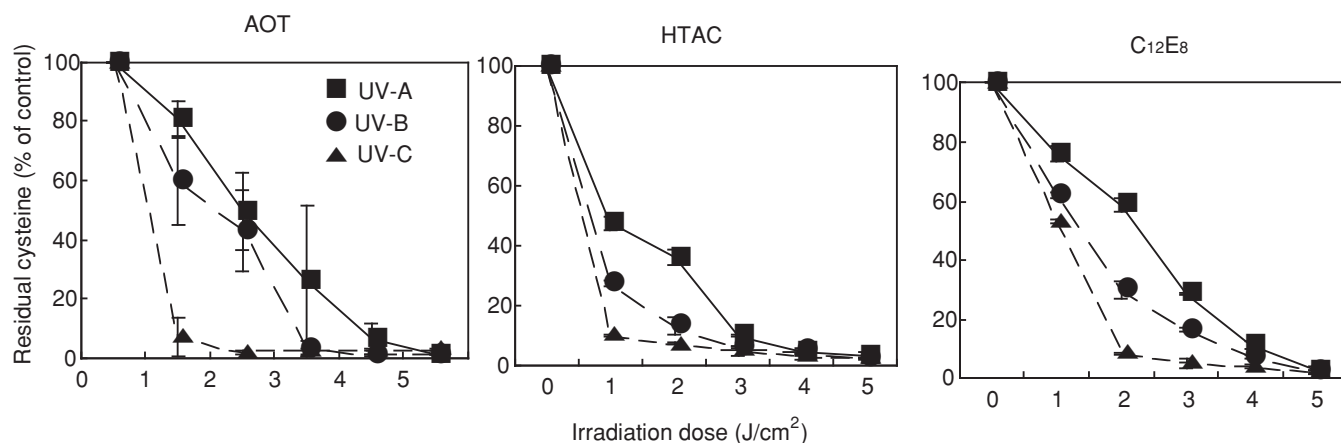


Fig.14 Conversion of cysteine as a function of irradiation dose

酸化されたことを意味するが、バルク水溶液に比べ、 $W_o = 20$ の AOT 逆ミセル系では顕著に進行することは大変興味深い。この反応が cysteine の cysteine への酸化であることを薄層クロマトグラフィーにより確認した。また紫外線の種類による減少率の違いは個々の紫外線がもつエネルギーの差によると考えられる。すなわち、UV のエネルギーが大きいほど酸化しやすいことを示している。また逆ミセルでは $20\text{J}/\text{cm}^2$ 照射で 3 種類の紫外線とも SH 基減少率が 90% 以上となったが、線量依存性があることも確認した。この結果は cysteine の変化に AOT 逆ミセルの water pool が重要であることが示唆された。

Fig. 14 に示したように 0.2MAOT 逆ミセル ($W_o = 20$) では UVA および UVB $2\text{J}/\text{cm}^2$ 照射時にはほぼ 50% の減少率となり、UVC に対してはさらに減少率が高くなり、 $1\text{J}/\text{cm}^2$ 照射ではほぼ反応が終了していることが観察された。一方、陽イオン性の 0.2MHTAC 逆ミセル ($W_o = 20$) の場合は $2\text{J}/\text{cm}^2$ 照射時に UVA で約 60%、UVB では 90% 以上の減少率を示した。UVC 照射では $1\text{J}/\text{cm}^2$ 照射でもかなり反応が進行していた。非イオン性の 0.2MC₁₂E₈ 逆ミセル ($W_o = 20$) の場合は $2\text{J}/\text{cm}^2$ 照射時に UVA は約 40%、UVB では約 70% の減少率を示し、UVC ではほとんど cysteine が酸化されていた。この結果より、紫外線の場合 $\text{HTAC} \geq \text{AOT} > \text{C}_{12}\text{E}_8$ の順に cysteine の変化が起りやすいと言える。この反応が静電場により影響を受けていることを示唆した。

このように cysteine の UV による酸化には膜界面の関与が示唆されたので、さらに膜界面の水の状態および膜電荷の影響について検討した。以下の実験では UVA および UVB では $2\text{J}/\text{cm}^2$ 、UVC では $0.5\text{J}/\text{cm}^2$ の線量で行った。 W_o 値を変えて水の状態の影響を、AOT、HTAC、C₁₂E₈ 界面活性剤の逆ミセルについて膜電荷の影響を検討した (Fig. 15)。界面活性剤の種類、紫外線の種類に関係なく、 W_o

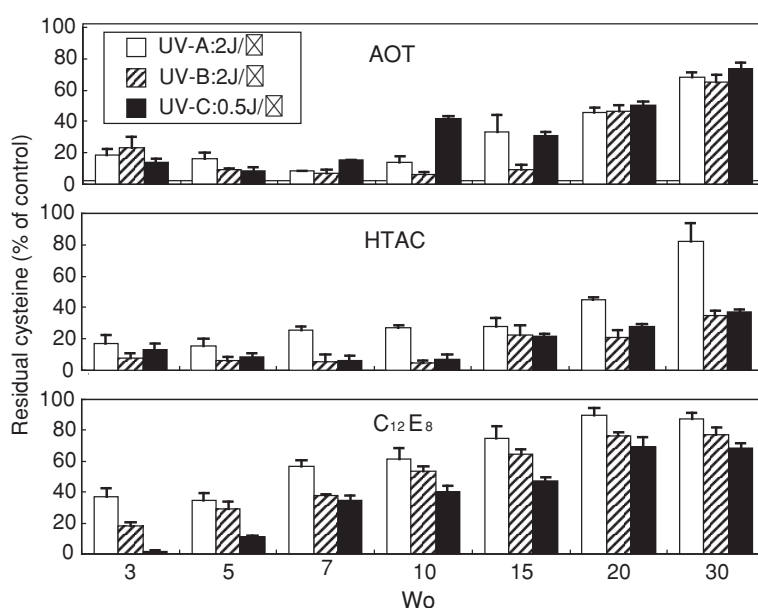


Fig.15 Conversion of cysteine in reversed micellar solution of various W_o by UV-irradiation

が大きくなるすなわち自由水の割合が増加するとともに cysteine の SH 基減少率が低くなり光重合が進行しにくいことが判明した。これは逆ミセル溶液は圧倒的に有機溶媒が多い状態であるにもかかわらず、内殻水の状態により SH 基減少率に差があったことを意味する。このことよりこの反応は有機相より水相が重要であること即ち結合水が重要であることが確認された。従って W_o の増加とともに反応率が低下するのは cysteine が自由水中に多く存在することにより、反応が進行しにくくなるためと推測された。同じ W_o 値でも検討した界面活性剤によっても SH 基減少率に差が確認された。全体的に見て $\text{HTAC} \geq \text{AOT} > \text{C}_{12}\text{E}_8$ の順に反応が起りやすいことが観察された。この結果も前述したように電荷が関与していることを示しており、cysteine の逆ミセル界面での配向の仕方が影響していると推測される。また紫外線と同じ W_o 値の UVA と UVB を比較した場合には UVB の方がより反応を進行させた。

逆ミセルの内殻水中の cysteine の存在場所は、両性の電荷を持つためおそらく均一に存在していると考えられるが、逆ミセルの界面の電荷により cysteine の配向は若干異なっていると推測される。いずれにしても SH 化合物が膜界面に多く存在すればより反応は進行しやすいと考えられる。そこで長いアルキル側鎖による疎水性のために逆ミセルの膜界面に多く存在すると推測される n-dodecanethiol を用いて検討した (Fig. 16)。紫外線によって cysteine とは逆に W_o が大きくなると SH 基減少率が高くなった。これは W_o が小さい場合は膜界面に出ている SH 基が少ないために反応率が低下し、 W_o が大きくなると内殻水のサイズが大きくなり、膜界面の SH 基が増加したために反応率が高くなったと考えられた。n-dodecanethiol の反応率が cysteine に比べて相対的に低いのは n-dodecanethiol のかなりの量が有機溶媒 (Isooctane) 中に存在しているためと考えられる。このことは n-dodecanethiol を Isooctane または Methanol に溶解させて、同様に紫外線や放射線を照射して SH 基の変化を検討したが、ほとんど SH 基の減少は見られなかったこのことから確かめられた。これらの結果はさらに結合水の存在の重要性とともに膜界面の必要性を示した。

以上より逆ミセル中 cysteine の SH 基がで紫外線によって酸化され、主として cystine が生成することが明らかとなった。紫外線照射によって一重項酸素、過酸化水素、スーパーオキシドアニオン、水酸化ラジカルなどの活性酸素が生成することが報告されている^{26~29)}。活性酸素の生成には溶存酸素が必要であると考えられるので、まず使用する溶媒を窒素置換して溶存酸素の影響を調べた。Fig. 17 から明らかなように W_o が 7 および 20 のいずれにおいても、SH 基減少率の低下が確認された。従ってこの cysteine の変化に酸素が関与していることが示唆された。また一般的に膜界面には溶存酸素が安定的に存在するとされているので、 $W_o = 7$ のとき回復の割合が $W_o = 20$ に比べて低いのは、今回行った窒素置換条件では十分に溶存酸素が除去できなかったものと考えられた。

次に一重項酸素の関与をクエンチャーである NaN_3 を用いて検討した。UVA、UVB、UVC 共に $W_o = 7$ および 20 で SH 基減少率の低下が観察された (Fig. 18)。UVB、UVC、放射線照射によって一重項酸素は生成しないと考えられているので、 NaN_3 による SH 基減少率の低下はこの試薬が他の生成した活性酸素種を阻害したことによるものと推測している。一例としてヒドロキシラジカル (OH ラジカル) を阻害することが報告されている。そこでその他の活性酸素の影響をまず親水性の抗酸化剤である Trolox の作用について検討した (Fig. 19)。いずれの

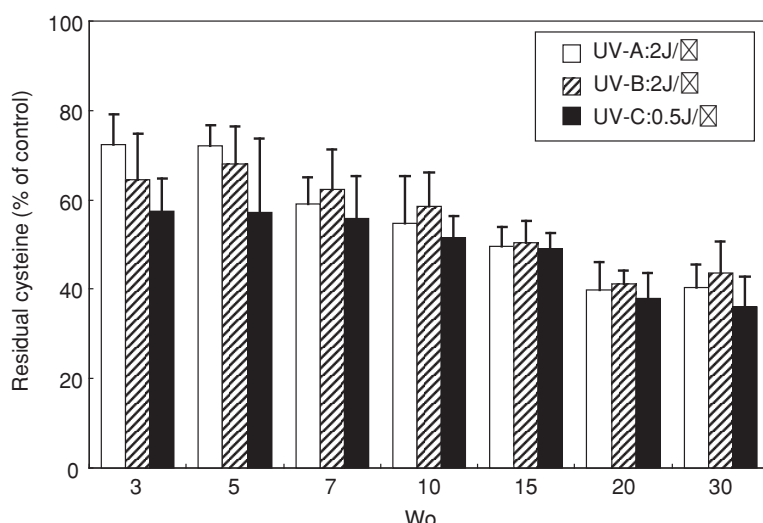


Fig. 16 Conversion of 1-dodecanethiol in AOT reversed micellar solution of various W_o by UV-irradiation

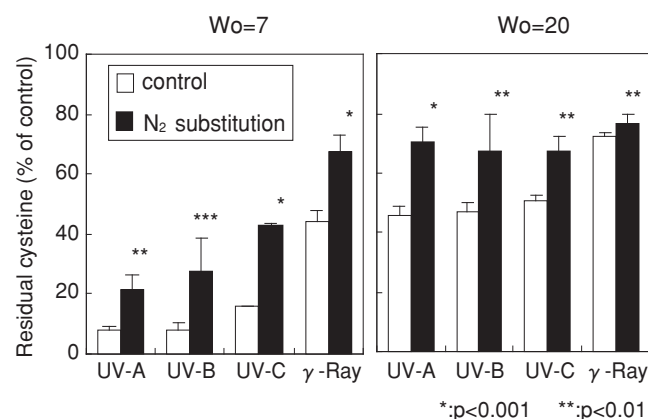


Fig. 17 Effect of nitrogen substitute on conversion of cysteine in AOT reversed micelles by UV irradiation

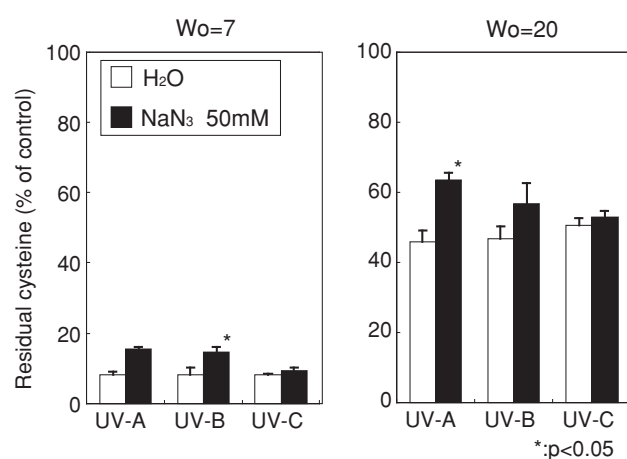


Fig. 18 Effect of NaN_3 on conversion of cysteine in AOT reversed micelles by UV irradiation

紫外線でも SH 基減少率が低下した。 $W_o = 7$ と 20 では Trolox の作用に差は認められなかった。これらの結果は逆ミセル内殻水に存在する抗酸化剤はある程度活性酸素の発生を抑制することを示した。さらに疎水性の抗酸化剤

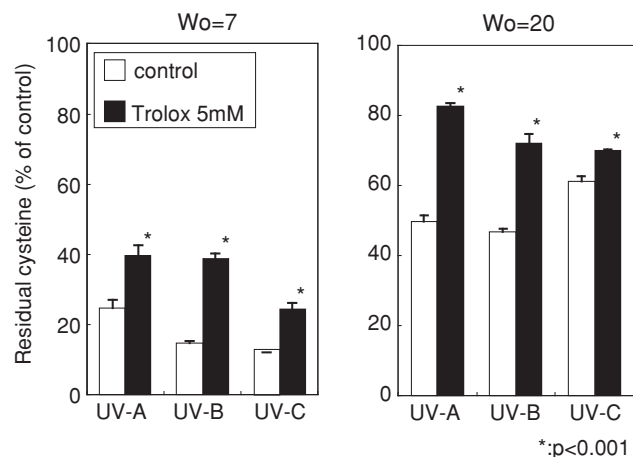


Fig.19 Effect of Trolox on conversion of cysteine in AOT reversed micelles by UV irradiation

である vitamin E は有機溶媒中あるいは膜界面近くに存在すると考えられる。Fig. 19 から明らかなように、UVA、UVB、UVC に対して顕著に SH 基減少率の低下を示した。特に $W_o = 7$ においては Trolox より強く作用している傾向が観察された。従って活性酸素は主として膜界面近傍で多く発生すると推測された。

無生物系への紫外線照射によっても活性酸素が発生することが観察され、その発生には膜界面、結合水、電荷などが重要な点であることが示された。このことは生体膜においても膜界面に存在する SH 基を持つ蛋白質成分が、紫外線照射によって影響を受けやすいことを示唆した。

4. 結 論

in vivo の脂質界面の水の性質や電場効果が生理作用とどのように関わるかは重要な課題であるが、in vitro でそのモデル実験を構築することはむずかしい。我々グループの研究対象である逆ミセルの water pool の水分子は動的な柔らかい単分膜に包まれ、 W_o が低い領域では界面活性剤の親水基とその対イオンの結合水として存在するが、 W_o がある大きさを超えると、water pool の中央に自由水が出現するようになる。従って W_o を連続的に変化させると結合水と自由水の割合を制御でき、その上、極性や電場も制御可能であり、脂質界面の水の性質や電場効果が生理機能との関わりについての知見が期待される。本研究では脂質界面の水の性質や電場効果が酵素反応に与える影響と紫外線照射に活性酸素の発生への影響を逆ミセルを用いて検討した。

その結果、以下の点が明らかにされた。

- 1) in vivo の研究で膜界面や水の性質に大きく依存すると推測される HK については、逆ミセルを用いて明らかにすることができた。すなわち強い電場は基質や酵素の局所的な位置を大きく変化させ、特に負電荷の膜は HK の活性発現に好ましくない。またエチレンオキサイド鎖近

傍の結合水は HK の酵素活性発現に有利に働くことが判明した。

- 2) PNPase の酵素活性発現には膜の電荷により、金属触媒の作用は強く依存し、エチレンオキサイド鎖をもつ $C_{12}E_8$ 逆ミセル系では、 Fe^{3+} が有効に作用し、さらに温度を上昇することにより、エチレンオキサイド鎖の結合水の状態を制御し、高分子の poly (A) を沈殿させ、単離しやすくできる系であることが判明した。
- 3) 膜界面の結合水は紫外線により発生した活性酸素の寿命を長くしチオール化合物を容易に酸化することを明らかにし、in vitro のモデル実験は膜蛋白質の SH 基が紫外線により容易に酸化され、膜蛋白質の構造や生体膜の状態を変化させ、情報伝達などに影響を与えることを支持した。

謝辞

本研究は静岡県立大学大学院生活健康科学研究科五島廉輔教授、伊吹裕子助手とそのグループとの共同研究でなされたものであり、ここに謝意を表する。

(参考文献)

- 1) 五島綾子, 逆ミセル内殻水の性質, 表面, 32,96(1993).
- 2) A. Goto and H. Kishimoto, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1990, 73.
- 3) A. Goto and H. Kishimoto, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1990, 891.
- 4) A. Goto, H. Yoshioka, H. kishimoto, T. Fijita, Langmuir, 8, 441(1992).
- 5) A. Goto, S. Harada, T. Fujita, Y. Miwa, H. Yoshioka, and H. Kishimoto, Langmuir, 9, 86(1993).
- 6) A. Goto, H. Yoshioka, M. Manabe, and R. Goto, Langmuir, 11, 4873(1995).
- 7) A. Goto, Y. Kuwahara, S. Suzuki, H. Yoshioka, R. Goto, H. Iwamoto, and T. Imae, J. Mol. Liquid, 72, 137(1997)
- 8) P. Walde, A. Goto, p-A. Monnard, M. Wessicken, and P. L. Luisi, J. Amer. Chem. Soc., 116, 7541-7547(1994).
- 9) A. Goto, K. Hakamda, Y. Kuwabara, R. Goto, P. Walde, P. L. Luisi, and T. Imae, Prog. Colloid & Polymer Science, 106, 245(1997).
- 10) A. Goto, R. Goto, Y. Kuwahata, H. Hakamada, Y. Ibuki, P. Walde, P. L. Luisi, and T. Imae, Langmuir, 14, 3454(1998)
- 11) Y. Kuwahara, A. Goto, Y. Ibuki, K. Yamaguchi, and R. Goto, J. Colloid Interface Sci., 233, 190(2001).
- 12) K. C. Pedley, G. E. Jones, M. Magnani, R. J. Rist, and R. J. Nabtalin, Biochem. J. 291, 515(1993).
- 13) P. G. Plokis, J. E. Wilson, Arch. Biochem. Biophys.

- 236, 328 (1985).
- 14) R. M. Lynch, K. E. Forarty, F. S. Fay, J. Cell Biology, 112, 383(1991).
- 15) A. E. Aleshin, H. J. Fromm, R. B. Honzatko, FEBS Letter 434, 42(1998).
- 16) D. Ardail, J-P. Privat, M. Egret-Charlier, C. Levrat, F. Lerme, and P. Louisot, J. Biol. Chem. 265, 18797(1990).
- 17) E. A. -Foucher, B. Fonte, D. C. Gautheron, Arch. Biochem. Biophys. 232, 391(1984).
- 18) K. Martinek N. L. Klyyacho, A. V. Kavanov, Y. L. Khmelnitsk, A. V. Levasov, Biochim. Biophys. Acta, 981, 161(1989)
- 19) Z. M. Zhu, K. I. Feng, Z. A. Schelly, J. Phys. Chem. 96, 2382 (1992).
- 20) S. P. Moulik, M. L. Das, P. K. Bhattacharya, A. R. Das, Langmuir, 8, 2315(1992).
- 21) A. Goto, H. Suzumori, Y. Ibuki, K. Yamazaki, and R. Goto, "Polyelectrolytes" edited by I. Noda and E. Kokufuta, Yamada Conference L. 1999.
- 22) K. Beljanski, J. Mol. Evol., 42, 493(1996).
- 23) R. Goto, H. Goto Y. Ibuki, A. Goto, 13th International Congress on Photobiology and 28th Annual Meeting American Society for photobiology, July, 2000, San Francisco
- 24) Rossette, C. and Karin, M., Science, 274, 1194(1996).
- 25) Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A. and Herrlich, P., EMBO J., 15, 5314(1996).
- 26) McCormick, J. P., Fischer, J. R., Pachlatko, J. P. and Eisenstark, A., Science, 191, 468(1976).
- 27) Horio, T. and Okamoto, H., J. Invest. Dermat., 88, 699(1987).
- 28) Tyrrell, R. M. and Pidoux, M., Photochem. Photobiol., 49, 407 (1989).
- 29) Masaki, H., Atsumi, T. and Sakurai, H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 206, 474(1995).